

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29198PC ps	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 06692	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/07/1999
Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl der Anspruch 29, soweit er eine Therapie betrifft, die eine in vivo Anwendung beinhaltet, sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/864 C12N15/35 C12N15/62 C07K14/015 C12N5/10
A61K39/23 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 38723 A (BARBER JACK ; IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) Seite 4, Zeile 21 - Seite 5, Zeile 2 Seite 17, Zeile 11 - Seite 18, Zeile 2 Seite 26, Zeile 17 - Seite 27, Zeile 7 Beispiel 1 Beispiel 2 --- -/--	1-15, 21-29



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>YANG Q. ET AL.: "DEVELOPMENT OF NOVEL CELL SURFACE CD34-TARGETED RECOMBINANT ADENOASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, Bd. 9, Nr. 13, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 1929-1937, XP000867311 ISSN: 1043-0342 das ganze Dokument</p>	1-15, 21-29
A	<p>VALSESIA-WITTMANN S. ET AL.: "MODIFICATIONS IN THE BINDING DOMAIN OF AVIAN RETROVIRUS ENVELOPE PROTEIN TO REDIRECT THE HOST RANGE OF RETROVIRAL VECTORS"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 7, 1. Juli 1994 (1994-07-01), Seiten 4609-4619, XP000616602 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-29
A	<p>WICKHAM T. J. ET AL.: "Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 11, Nr. 71, 1. November 1997 (1997-11-01), Seiten 8221-8229, XP002078898 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-29
A	<p>WO 96 00587 A (UNIV PITTSBURGH) 11. Januar 1996 (1996-01-11) Seite 5, Zeile 10 - Zeile 14 Seite 23, Zeile 11 -Seite 24, Zeile 25</p>	1-29
P,X	<p>GIROD A. ET AL.: "GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2"</p> <p>NATURE MEDICINE, Bd. 5, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 1052-1056, XP002128040 ISSN: 1078-8956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-15, 21-25
P,X, L	<p>WO 99 67393 A (MEDIGENE AKTIENGESellschaft ;RIED MARTIN (DE); GIROD ANNE (DE); HA) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) L: Priorität das ganze Dokument</p>	1-26,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT 00/06692

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9738723 A	23-10-1997	AU 2678097 A CA 2251738 A EP 0927044 A	07-11-1997 23-10-1997 07-07-1999
WO 9600587 A	11-01-1996	AU 705564 B AU 2913895 A CA 2193802 A EP 0766569 A JP 10502526 T US 5863541 A	27-05-1999 25-01-1996 11-01-1996 09-04-1997 10-03-1998 26-01-1999
WO 9967393 A	29-12-1999	DE 19827457 C AU 4614199 A	02-03-2000 10-01-2000

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 13 March 2001 (13.03.01)	Applicant's or agent's file reference M29198PC ps
International application No. PCT/EP00/06692	Priority date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)
International filing date (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)	
Applicant HALLEK, Michael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

25 January 2001 (25.01.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Juan Cruz
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

BÖSL, Raphael
Bardehle, Pagenberg, Dost,
Altenburg, Geissler, Isenbruck
Galileiplatz 1
D-81679 München
ALLEMAGNE

Patent- u. Rechtsanwälte
Galileiplatz 1, München

27. Nov. 2000

Frist:

Date of mailing (day/month/year) 16 November 2000 (16.11.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference M29198PC ps	
International application No. PCT/EP00/06692	International filing date (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

HALLEK, Michael
Brunnenstrasse 40
D-89638 Schondorf
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

HALLEK, Michael
Brunnenstrasse 40
D-89638 Schondorf
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Clémentines
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Elisabeth KÖNIG
Elisabeth KÖNIG

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



152
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference M29198PC ps	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/06692	International filing date (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)	Priority date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/864, 15/35, 15/62, C07K 14/015, C12N 5/10, A61K 39/23, 48/00		
Applicant MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 25 January 2001 (25.01.01)	Date of completion of this report 02 November 2001 (02.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-21 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-29 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/06692

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	16-20	YES
	Claims	1-15, 21-29	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-29	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-28	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1. Reference is made to the following documents:**

D1: WO-A-97/38723 (BARBER JACK; IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU), 23 October 1997 (1997-10-23)

D2: GIROD A. ET AL.: 'GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2' NATURE MEDICINE, Vol. 5, No. 9, September 1999 (1999-09), pages 1052-1056, XP00218040 ISSN: 1078-8956, mentioned in the application.

2. Document D1 discloses an AAV vector with modified capsid proteins in which part of the VP1 or VP3 sequence has been replaced by targeting ligands (page 4, line 21 - page 5, line 2; page 17, line 11 - page 18, line 2; page 26, line 17 - page 27, line 7; Example 1, 2C).

D1 therefore discloses all of the technical features of the object of Claims 1-15 and 21-29, contrary to the requirements of PCT Article 33(2). The property

of reducing antigenicity is considered an inherent feature which contributes nothing to novelty.

3. The object of Claims 16-20 differs from the vectors disclosed in D1 in the selection of the modification in the AAV capsid proteins.

The problem addressed by the present invention can therefore be considered that of producing further structural proteins of AAV containing at least one modification which reduces the antigenicity of the virus.

However, it is apparent from the present application (Tables 1 and 2) and from document D2 (page 1054, right-hand column) that only very specific modifications in the AAV capsid proteins actually solve the problem. ~~Since Claims 16-20 contain~~ modifications which do not solve the problem, they cannot be considered inventive and therefore do not meet the requirements of PCT Article 33(3).

4. Claim 29 relates to a subject matter which, in the opinion of this Authority, falls under PCT Rule 67.1(iv). Therefore, a report as to the industrial applicability of the use of these claims is not established (PCT Article 34(4)(a)(i)).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

5. Claims 1-15 and 21-29 relate to a structural protein of an AAV, characterised in each case by a desirable property, namely that the structural protein contains at least one modification which brings about a reduction in the antigenicity of the virus. The claims therefore include all structural proteins which have this characteristic or property, whereas the application is supported by the description (PCT Article 6) only for a limited number of such structural proteins and only a limited number of structured proteins are disclosed (PCT Article 5).
6. Furthermore, the claims also lack the clarity required under PCT Article 6 in that they attempt to define the product by means of the desired result.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29198PC ps	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 06692	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/07/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 15/07/1999
Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT 00/06692

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/864 C12N15/35 C12N15/62 C07K14/015 C12N5/10
A61K39/23 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	✓ WO 97 38723 A (BARBER JACK ; IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) Seite 4, Zeile 21 - Seite 5, Zeile 2 Seite 17, Zeile 11 - Seite 18, Zeile 2 Seite 26, Zeile 17 - Seite 27, Zeile 7 Beispiel 1 Beispiel 2C --- -/--	1-15, 21-29



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>YANG Q. ET AL.: "DEVELOPMENT OF NOVEL CELL SURFACE CD34-TARGETED RECOMBINANT ADENOASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, Bd. 9, Nr. 13, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 1929-1937, XP000867311✓ ISSN: 1043-0342 das ganze Dokument</p>	1-15, 21-29
A	<p>--- VALSESIA-WITTMANN S. ET AL.: "MODIFICATIONS IN THE BINDING DOMAIN OF AVIAN RETROVIRUS ENVELOPE PROTEIN TO REDIRECT THE HOST RANGE OF RETROVIRAL VECTORS"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 7, 1. Juli 1994 (1994-07-01), Seiten 4609-4619, XP000616602✓ ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-29
A	<p>--- WICKHAM T. J. ET AL.: "Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 11, Nr. 71, 1. November 1997 (1997-11-01), Seiten 8221-8229, XP002078898 ✓ ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-29
A	<p>--- ✓WO 96 00587 A (UNIV PITTSBURGH) 11. Januar 1996 (1996-01-11) Seite 5, Zeile 10 - Zeile 14 Seite 23, Zeile 11 -Seite 24, Zeile 25</p>	1-29
P,X	<p>--- GIROD A. ET AL.: "GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2"</p> <p>NATURE MEDICINE, Bd. 5, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 1052-1056, XP002128040✓ ISSN: 1078-8956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-15, 21-25
P,X, L	<p>--- ✓WO 99 67393 A (MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT ;RIED MARTIN (DE); GIROD ANNE (DE); HA) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) L: Priorität das ganze Dokument</p>	1-26,29



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



WEITERE ANGABEN

PCT/SA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl der Anspruch 29, soweit er eine Therapie betrifft, die eine in vivo Anwendung beinhaltet, sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT 00/06692

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9738723 A	23-10-1997	AU 2678097 A CA 2251738 A EP 0927044 A	07-11-1997 23-10-1997 07-07-1999
WO 9600587 A	11-01-1996	AU 705564 B AU 2913895 A CA 2193802 A EP 0766569 A JP 10502526 T US 5863541 A	27-05-1999 25-01-1996 11-01-1996 09-04-1997 10-03-1998 26-01-1999
WO 9967393 A	29-12-1999	DE 19827457 C AU 4614199 A	02-03-2000 10-01-2000



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REGD 06 NOV 2001

IPC

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29198PC Bö/sa	-WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06692	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 15/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/864		
Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Schwachtgen, J-L Tel. Nr. +49 89 2399 8933 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-29 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	16-20
	Nein: Ansprüche	1-15 21-29
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-29
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-28
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 97 38723 A (BARBER JACK ;IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU) 23. Oktober 1997 (1997-10-23)

D2: GIROD A. ET AL.: 'GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2' NATURE MEDICINE, Bd. 5, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 1052- 1056, XP002128040 ISSN: 1078-8956 in der Anmeldung erwähnt

-
2. Dokument D1 offenbart ein AAV Vektor mit modifizierten Kapsid-Proteinen in denen ein Teil der Sequenz von VP1 oder VP3 durch zielgerichtete Liganden (targeting ligands) ersetzt worden ist (Seite 4, Zeile 21-Seite 5, Zeile 2; Seite 17, Zeile 11-Seite 18, Zeile 2; Seite 26, Zeile 17-Seite 27, Zeile 7; Beispiel 1, 2C)

D1 offenbart dementsprechend all technischen Merkmale des Objektes der Ansprüche 1-15 und 21-29, entgegen den Erfordernissen des Artikel 33(2) PCT.. Die Eigenschaft der Verringerung der Antigenität wird als inhärentes Merkmal angesehen das nicht zur Neuheit beitragen kann.

3. Das Objekt der Ansprüche 16-20 unterscheidet sich von den in D1 offenbarten Vektoren durch die Wahl der Modifikation in den AAV Kapsid Proteinen.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden weitere Strukturproteine von AAV herzustellen, die mindestens eine Modifikation enthalten die eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt.

Es geht aber aus der vorliegenden Anmeldung (Tabellen 1 und 2) und aus Dokument D2 (Seite 1054, rechte Kolonne) hervor daß nur ganz bestimmte Modifikationen in den AAV Kapsid Proteinen die Aufgabe tatsächlich lösen. Da die Ansprüche 16-20 Modifikationen enthalten welche die Aufgabe nicht lösen, können sie nicht als erfinderisch angesehen werden und entsprechen daher nicht den Erfordernissen des Artikel 33(3) PCT.

4. Der Anspruch 29 bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

5. Die Patentansprüche 1-15 und 21-29 beziehen sich auf ein Strukturprotein eines AAV, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenschaft, nämlich daß das Strukturprotein mindestens eine Modifikation enthält die eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt. Die Patentansprüche umfassen daher alle Strukturproteine, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Art. 6 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Strukturproteine gestützt wird und nur eine begrenzte Zahl Strukturproteine im Sinne von Art. 5 PCT offenbart sind.
6. Außerdem fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M29198PC Bö/sa	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/06692	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 13/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 15/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/864		
Anmelder MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/01/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 02.11.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Schwachtgen, J-L Tel. Nr. +49 89 2399 8933 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-21 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-29 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

1

2

3

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	16-20
	Nein: Ansprüche	1-15 21-29
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-29
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-28
	Nein: Ansprüche	

- 2. Unterlagen und Erklärungen**
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 97 38723 A (BARBER JACK ;IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU) 23. Oktober 1997 (1997-10-23)

D2: GIROD A. ET AL.: 'GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2' NATURE MEDICINE, Bd. 5, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 1052- 1056, XP002128040 ISSN: 1078-8956 in der Anmeldung erwähnt

-
2. Dokument D1 offenbart ein AAV Vektor mit modifizierten Kapsid Proteinen in denen ein Teil der Sequenz von VP1 oder VP3 durch zielgerichtete Liganden (targeting ligands) ersetzt worden ist (Seite 4, Zeile 21-Seite 5, Zeile 2; Seite 17, Zeile 11-Seite 18, Zeile 2; Seite 26, Zeile 17-Seite 27, Zeile 7; Beispiel 1, 2C)

D1 offenbart dementsprechend all technischen Merkmale des Objektes der Ansprüche 1-15 und 21-29, entgegen den Erfordernissen des Artikel 33(2) PCT.. Die Eigenschaft der Verringerung der Antigenität wird als inhärentes Merkmal angesehen das nicht zur Neuheit beitragen kann.

3. Das Objekt der Ansprüche 16-20 unterscheidet sich von den in D1 offenbarten Vektoren durch die Wahl der Modifikation in den AAV Kapsid Proteinen.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden weitere Strukturproteine von AAV herzustellen, die mindestens eine Modifikation enthalten die eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt.

11

Es geht aber aus der vorliegenden Anmeldung (Tabellen 1 und 2) und aus Dokument D2 (Seite 1054, rechte Kolonne) hervor daß nur ganz bestimmte Modifikationen in den AAV Kapsid Proteinen die Aufgabe tatsächlich lösen. Da die Ansprüche 16-20 Modifikationen enthalten welche die Aufgabe nicht lösen, können sie nicht als erfinderisch angesehen werden und entsprechen daher nicht den Erfordernissen des Artikel 33(3) PCT.

4. Der Anspruch 29 bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

5. Die Patentansprüche 1-15 und 21-29 beziehen sich auf ein Strukturprotein eines AAV, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenschaft, nämlich daß das Strukturprotein mindestens eine Modifikation enthält die eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt. Die Patentansprüche umfassen daher alle Strukturproteine, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung durch die Beschreibung im Sinne von Art. 6 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Strukturproteine gestützt wird und nur eine begrenzte Zahl Strukturproteine im Sinne von Art. 5 PCT offenbart sind.
6. Außerdem fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
25. Januar 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/05990 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/864,
15/35, 15/62, C07K 14/015, C12N 5/10, A61K 39/23,
48/00

GIROD, Anne [FR/DE]; Appenzeller Strasse 123,
D-81475 München (DE). RIED, Martin [DE/DE]; Am
Lohwald 36, D-86697 Sinning (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06692

(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost,
Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679
München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Juli 2000 (13.07.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 33 288.6 15. Juli 1999 (15.07.1999) DE

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Planegg/Mar-
tinsried (DE).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HALLEK, Michael
[DE/DE]; Brunnenstrasse 40, D-86938 Schondorf (DE).

(54) Title: STRUCTURAL PROTEIN OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS WITH MODIFIED ANTIGENICITY, ITS PRODUCTION AND ITS USE

(54) Bezeichnung: STRUKTURPROTEIN VON ADENO-ASSOZIIERTEM VIRUS MIT VERÄNDERTER ANTIGENITÄT, SEINE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a structural protein of adeno-associated virus (AAV) that contains at least one modification that reduces the antigenicity of said virus. The invention further relates to the production of said structural protein and to its use.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus (AAV), das mindestens eine Modifikation enthält, die eine Verringerung der Antigenität bewirkt, seine Herstellung und Verwendung.



WO 01/05990 A1



Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus mit veränderter Antigenität, seine Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus (AAV), das mindestens eine Modifikation enthält, die eine Verringerung der Antigenität bewirkt, seine Herstellung und Verwendung.

Das AAV-Virus gehört zur Familie der Parvoviren. Diese zeichnen sich durch ein ikosaedrisches, unbehülltes Kapsid mit einem Durchmesser von 18 bis 30 nm aus, welches eine lineare, einzelsträngige DNA von ca. 5 kb enthält. Für eine effiziente Vermehrung von AAV ist eine Coinfektion der Wirtszelle mit Helferviren, beispielsweise mit Adenoviren, Herpesviren oder Vacciniaviren erforderlich. In Abwesenheit eines Helfervirus geht AAV in einen Latenzzustand über, wobei das Virusgenom in der Lage ist, stabil in das Wirtszellgenom zu integrieren. Die Eigenschaft von AAV, in das Wirtszellgenom zu integrieren, macht es als Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant. Für die Vektorfunktionen genügen im allgemeinen die beiden ca. 145 bp langen invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR: "Inverted Terminal Repeats"). Sie tragen die "cis" notwendigen Signale für Replikation, Verpackung und Integration in das Wirtszellgenom. Zur Verpackung in rekombinante Vektorpartikel wird ein Helferplasmid, welches die Gene für nicht-strukturelle Proteine (Rep-Proteine) und für strukturelle Proteine (Cap-Proteine) trägt, in verpackungsg geeignete Zellen, z.B. HeLa- oder 293-Zellen, transfiziert, die hierauf beispielsweise mit Adenovirus infiziert werden. Nach einigen Tagen erhält man ein Lysat, welches rekombinante AAV-Partikel enthält. Geeignete Helferplasmide sind z.B. bei Chiorini et al., (1995) Hum. Gene Ther. 6, 1531-1541 oder Girod et al. (1999), Nat. Med. beschrieben.

Das AAV-Kapsid besteht aus drei verschiedenen Proteinen: VP1, VP2 und VP3, deren relative Anteile 5% VP1, 5% VP2 und 90% VP3 sind. Die AAV-Kapsidgene sind am rechten Ende des AAV-Genoms lokalisiert und werden durch überlappende Sequenzen desselben offenen Leserahmens (ORF) unter Verwendung verschiedener Startkodons sowie zweier unterschiedlich gespleißter Varianten eines Transkripts kodiert. Das VP1-Gen enthält die ganze VP2-

Genesequenz, welche wiederum die ganze VP3-Genesequenz mit einem spezifischen N-terminalen Bereich enthält. Die Tatsache, daß die überlappenden Leserahmen für alle drei AAV-Kapsid-Proteine kodieren, ist für die obligatorische Expression aller Kapsid-Proteine, wenn auch zu unterschiedlichen Anteilen, verantwortlich.

5

Die Molekularmassen der Kapsid-Proteine sind 87 kD für VP1, 73 kD für VP2 und 62 kD für VP3. Die Sequenzen der Kapsidgene sind in Srivastava, A. et al. (1983), J. Virol., 45, 555-564; Muzyczka, N. (1992), Curr. Top. Micro. Immunol., 158, 97-129, Ruffing, N. et al. (1992), J. Virol., 66, 6922-6930 oder Rutledge, E. A. et al. (1998) J. Virol. 72, 309-319 beispielsweise
10 beschrieben. Die physikalische und genetische Karte des AAV-Genoms ist beispielsweise bei Kotin, R. M. (1994), Human Gene Therapy, 5, 793-801 beschrieben.

Zudem sind verschiedene AAV-Serotypen bekannt, von denen der menschliche AAV-Serotyp 2 (AAV2) am besten untersucht ist. In diesen Analysen zeigte sich, daß AAV Viren als virale
15 Vektoren vorteilhafte Eigenschaften für die somatische Gentherapie besitzen. Die wesentlichen Vorteile sind die fehlende Pathogenität für den Menschen, die stabile Integration viraler DNA in das zelluläre Genom, die Fähigkeit, nicht teilende Zellen zu infizieren, die Stabilität des Virions, was die Aufreinigung zu hohen Titern (10^{13} bis 10^{14} Partikel pro ml) ermöglicht, die relativ geringe Immunogenität sowie das Fehlen viraler Gene und Genprodukte im rekombinanten
20 AAV-Vektor, was unter Sicherheitsaspekten für die Verwendung in der Gentherapie vorteilhaft ist. Die Klonierung von Genen in den AAV-Vektor erfolgt mittlerweile nach den dem Fachmann allgemein bekannten Methoden, wie sie z.B. in WO 95/ 23 867, bei Chiorini, J. A. et al. (1995), Human Gene Therapy, 6, 1531-1541 oder bei Kotin, R. M. (1994), supra, beschrieben sind.

25 Der Einsatz gerade viraler Vektoren in der Gentherapie ist im hohen Maße von der Antigenität des verwendeten Systems abhängig, da mit einer hohen Antigenität auch eine verstärkte Immunantwort einhergeht, die mit dem Therapieerfolg interferieren könnte. Daher ist auch die Antigenität des AAV-Virus von entscheidender Bedeutung für dessen Verwendbarkeit in der Therapie. Unter dem Begriff Antigen versteht man Stoffe, die nach
30 Einführung in den Organismus von Menschen und Tieren eine spezifische Immunantwort auslösen. Diese äußert sich entweder in der Bildung von Antikörpern (humorale Immunantwort) und der Entwicklung einer zellvermittelten Immunität (zelluläre Immunantwort) oder einer spezifischen immunologischen Toleranz. Voraussetzung einer Immunantwort (für die Immunogenität des Antigens) ist im allgemeinen, daß das Antigen vom Organismus als fremd

erkannt wird, daß es ein MW > 1 kDa besitzt und der Stoffklasse der Proteine oder Polysaccharide, seltener Desoxyribonucleinsäuren oder Lipide angehört. Komplexere Strukturen wie z.B. Bakterien, Viren oder Erythrocyten (partikuläre Antigene) sind im allgemeinen noch wirksamere Antigene, besitzen also hohe Antigenität. Unter Antigenität versteht man daher im
5 Sinne dieser Erfindung die Fähigkeit mit dem Immunsystem (humorales und zelluläres) durch Bindung zu interagieren (erkannt zu werden). Der Begriff umfaßt dabei auch die Immunogenität, also auch die Fähigkeit zur Auslösung einer Immunantwort. Gerade bei Viren können dabei prinzipiell antigene Strukturen für die Antikörperbindung nicht nur durch die Primärstruktur, sondern auch durch die Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur der Kapsid-
10 Proteine bzw. Kapside bestimmt sein.

Chapman M. S. und Rossmann M. G. (1993), Virology, 194, 491-508 konnten durch Sequenzvergleiche mit verschiedenen Parvoviren, aus dem die antigenen Unterschiede zwischen den Kapsidproteinen vorhergesagt wurden, die wichtigsten Antigen-Determinanten des CPV-
15 Kapsids identifizieren. Nach dieser Untersuchung ist die Antigenität des CPV-Kapsid-Proteins primär an extern exponierte Loops mit hoher Sequenz-Variabilität gebunden. Beim AAV-Virus-Kapsid hingegen gibt es derartige Untersuchungen noch nicht. Lediglich die WO 96/00587 beschreibt AAV-Kapsid-Fusionsproteine, bei denen beispielsweise in die für ein Kapsid-Protein codierende DNA die für ein klinisch relevantes Antigen codierende DNA eingefügt wird, ohne
20 daß dies mit der Kapsidbildung interferiert, und das Konstrukt als AAV-Kapsid-Fusionsprotein exprimiert wird. Die klinisch relevanten Antigene sind Epitope, die beispielsweise aus Bakterien (z.B. Salmonella), Viren (z.B. env-HIV) oder Tumorzellen stammen. Die entstehenden AAV-Kapsid-Fusionsproteine sollen eine Immunantwort auslösen, also für eine gesteigerte Antigenität der AAV-Viren sorgen.

25 Eine verringerte Antigenität des AAV wird im Stand der Technik nicht diskutiert. Für die praktische Anwendung von AAV-Vektoren - gerade in der Gentherapie - ist aber eine verringerte Antigenität im Vergleich zum Wildtyp oder zu vom Wildtyp abgeleiteten AAV-Vektoren von Vorteil. Denn auch Wildtyp-AAV hat durchaus Antigen-Determinanten. So gibt es anti-AAV2
30 Ig positive Individuen, bei denen eine Therapie mit AAV-Vektoren einer Wildtyp-Antigenität zwangsläufig schwierig bis unmöglich ist. Ebenso könnte ein Patient bei wiederholter Therapie mit AAV-Vektoren zunehmend eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort gegen die verwendeten AAV-Vektoren entwickeln. Eine derartige Immunisierung würde den Erfolg einer Therapie schmälern bzw. verhindern. Je geringer also die Antigenität eines rekombinanten

AAV-Virus ist oder je mehr sich seine Antigenität von einem Wildtyp-Virus oder einem zuvor verwendeten rekombinanten AAV-Virus unterscheidet, desto erfolgversprechender erscheint dessen therapeutischer Einsatz.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, die Antigenität des AAV-Virus insbesondere eines Strukturproteins gegenüber dem Wildtyp zu verringern. Insbesondere sollten durch Modifikation AAV-Vektoren entwickelt werden, die einen spezifischen und effizienten Gentransfer ermöglichen, aber der Immunantwort besser oder vollständig entgehen. Daher sollte die Modifikation bevorzugt so erfolgen, daß sich gleichzeitig die Infektiosität des Virus nicht
10 wesentlich verringert oder zumindest erhalten bleibt.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Struktur- bzw. Kapsid-Proteine von AAV so modifiziert werden können, daß dadurch eine Verringerung der Antigenität bewirkt wird, wobei sich auch die Infektiosität nicht wesentlich verringert, diese zumindest erhalten bleibt.

- 15 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Strukturprotein von AAV, das mindestens eine Modifikation enthält, die eine Verringerung der Antigenität bewirkt.

- Unter der Verringerung der Antigenität versteht man im Sinne der Erfindung und obiger
20 Definitionen die Verringerung der Antikörperbildung und/oder Antikörperbindung durch Veränderung, Entfernen oder Hinzufügen bestimmter Sequenzen oder Epitope oder einer Kombination dieser Maßnahmen, insbesondere bestimmter im Wildtyp vorhandener Epitope und Sequenzen. Durch eine verminderte Antigenität wird beispielsweise eine Immunisierung eines Organismus durch eine Therapie mit einem AAV-Vektor verringert. Dabei ist auch eine
25 absolut gesehen, d.h. im Durchschnitt der Stärke der Immunantwort, lediglich veränderte Antigenität im Sinne dieser Erfindung als verringert anzusehen, wenn mit dem erfindungsgemäßen Strukturprotein eine Antikörper-(Immun-)Antwort nicht ausgelöst wird, die mit dem Wildtyp ausgelöst worden wäre. Eine derartige, absolut gesehen lediglich veränderte Antigenität kann zu einer verringerten Immunisierung führen, wenn bei aufeinanderfolgenden
30 Therapien erfindungsgemäße AAV-Vektoren mit unterschiedlicher Antigenität eingesetzt werden. Die veränderte Antigenität kann sich dabei sowohl auf die humorale wie auch die zelluläre Immunantwort beziehen.

Die verringerte Antigenität läßt sich für die humorale Immunantwort beispielsweise dadurch nachweisen, daß ein Antikörper, der an das unmodifizierte (Wildtyp-) AAV-Kapsid-Protein oder AAV-Kapsid binden kann, das erfindungsgemäße, modifizierte AAV-Kapsid-Protein oder AAV-Kapside nicht mehr oder wesentlich schlechter erkennt. Derartige Nachweise können
5 durch Standardverfahren wie ein Enzyme linked Immuno-absorbent Assay (ELISA) durchgeführt werden. Ein geeigneter Antikörper ist beispielsweise der A20 monoklonale Antikörper (siehe Wistuba, A. et al. (1997) J. Virol., 71, 1341-52), der spezifisch nur vollständig assemblierte AAV2-Kapside des Wildtyps erkennt, jedoch keine freien Kapsidproteine.

10 Für die zelluläre Immunantwort kann ein Nachweis der veränderten Antigenität darüber geführt werden, daß AAV-spezifische Immunzellen durch Antigen-präsentierende Zellen, die mit Partikeln aus modifizierten Strukturproteinen infiziert wurden, nicht so stark stimuliert werden wie durch Antigen-präsentierende Zellen, die mit Partikeln aus ursprünglichen Strukturproteinen infiziert wurden. Dieses Verfahren ist in Analogie zu den Verfahren für Vakzinia- und
15 Adenoviren (Tarpey, I. et al., (1994), Immunology, 81, 222-7; Nimako, M. et al., (1997), Cancer Res. 57, 4855-61). Die Stimulation der Immunzellen läßt sich beispielsweise durch einen Cytokinassay (Chapter 6.2 bis 6.24 in Current Protocols in Immunology (1999), edited by Coligan J.E. et al., John Wiley & Sons) quantitativ messen.

20 Es ist besonders bevorzugt, daß die Modifikation im erfindungsgemäßen Strukturprotein keine wesentliche Verringerung der Infektiosität des Virus bewirkt, bzw. die Infektiosität zumindest erhalten bleibt. Unter Infektiosität versteht man im Sinne dieser Erfindung die Fähigkeit, Zellen zu transduzieren.

25 Des weiteren ist das erfindungsgemäße Strukturprotein vorzugsweise weiterhin zur Partikelbildung, d.h. zur Ausbildung eines ikosaedrischen Kapsids, befähigt, insbesondere in Form eines AAV-Kapsids, da Partikel bzw. Kapside als Träger von ausgewählten Verbindungen, z.B. rAAV-Transduktionsvektoren, besonders geeignet sind. Die Bildung von Partikeln läßt sich beispielsweise durch Elektronenmikroskopie nachweisen. Ein anderer Nachweis ist das
30 Sedimentationsverhalten während einer Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation mit anschließendem, optionalen Nachweis von in den Partikeln enthaltener viraler DNA.

Im allgemeinen kann die Modifikation im VP1-, VP2- und/oder VP3-Strukturprotein liegen, wobei das VP1- und/oder das VP3-Strukturprotein bevorzugt sind. Des weiteren kann das

Strukturprotein von allen AAV-Serotypen abgeleitet sein, insbesondere von humanen Serotypen, vorzugsweise von AAV1, AAV2, AAV3, AAV4 AAV5 und/oder AAV6, vor allem von AAV2, AAV3 und/oder AAV6.

- 5 Vorzugsweise ist/sind die Modifikation/en an der Virusoberfläche lokalisiert. Zur Bestimmung der oberflächen-lokalisierten Bereiche der Strukturproteine wurde gemäß der vorliegenden Erfindung überraschenderweise gefunden, daß CPV(Canine-Parvovirus) - und AAV2-Sequenzen und -Strukturen vergleichbar sind. Man kann daher vorzugsweise auf bekannte Kristallstrukturen von Parvoviren wie von Parvovirus B19 oder von CPV zurückgreifen und mit Hilfe von
- 10 Homologievergleichen Proteindomänen identifizieren, die auf der Virusoberfläche lokalisiert sind. Gemäß der vorliegenden Erfindung hat daher beispielsweise ein computerunterstützter Vergleich zwischen CPV und AAV2 bzw. Parvovirus B19 und AAV2 überraschenderweise reproduzierbar zur Identifikation von Schleifen (Loops) in VP3 geführt, deren Sequenz variiert, d.h. die eine geringe Homologie besitzen und die voraussichtlich auf der Virusoberfläche
- 15 lokalisiert sind. Da die Antigene für die humorale Immunantwort für Antikörper zugänglich und somit auf der Virusoberfläche sein müssen, stellen diese Schleifen bevorzugte Kandidaten für Modifikationen dar. So wurde die bekannte Kristallstruktur des CPV VP2-Kapsid-Proteins (z.B. Luo M.(1988), J. Mol. Biol., 200, 209-211; Wu und Rossmann (1993), J.Mol.Biol., 233, 231-244; Tsao J. et al. (1991) Science, 251, 1456-1464) aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum
- 20 AAV2 VP3 in der sekundären Struktur des Proteins als Muster genommen, um die Regionen herauszufinden, die auf der viralen Kapsidoberfläche exponiert sind und die aufgrund der lokalen Aminosäuresequenz flexibel genug sind, beispielsweise die Insertion einer Peptidsequenz zu überstehen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß keine sekundären Strukturelemente des AAV2-Kapsidproteins ausgewählt wurden, die das Kapsid
- 25 destabilisieren würden.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Modifikation(en) am N-Terminus des Strukturproteins lokalisiert, da gefunden wurde, daß beispielsweise bei Parvovirus B19 der N-Terminus an der Zelloberfläche liegt.

30

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Oberflächen-lokalisierten Bereiche der Strukturproteine ist ein Vergleich der für die Kapside kodierenden Nukleinsäuresequenzen von unterschiedlichen AAV-Serotypen. Hierzu können beispielsweise bekannte DNA-Sequenzen unterschiedlicher AAV-Serotypen, wie AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 oder AAV6, für

Strukturanalysen möglicher Kapsidmorphologien von beispielsweise AAV2 herangezogen werden, wobei ab initio mögliche Tertiärstrukturen berechnet und Sequenzbereiche aufgrund allgemein bekannter Aminosäure-Eigenschaften den inneren oder äußeren Kapsidbereichen zugeordnet werden können. So konnten beispielsweise gemäß der vorliegenden Erfindung
5 mögliche Insertionsstellen im VP3-Bereich des AAV2-Kapsids ermittelt werden, die die Insertion beispielsweise von Peptiden und deren Expression auf der Virusoberfläche ermöglichten (siehe unten).

Unter einer Modifikation wird z. B. eine Veränderung der Kapsidproteine verstanden, die durch
10 kovalente oder nicht-kovalente Bindung eines Moleküls an eine oder mehrerer Aminosäuren oder Aminosäuresequenzen erzielt wird. So kann ein Kapsidprotein z. B. durch kovalente Bindung von Mono- oder Oligosacchariden, Biotin oder anderen hochmolekularen Verbindungen an eine oder mehrere Aminosäuren modifiziert werden. Die Modifikation kann aber auch durch kovalente Bindung niedermolekularer Verbindungen wie einer Hydroxylgruppe
15 an eine oder mehrere Aminosäuren erreicht werden. Ferner können Moleküle oder Molekül-Komplexe über nicht-kovalente Bindung an die Kapsidproteine angelagert werden und so antigene Regionen abschirmen. Dies kann beispielsweise die Antigen-Bindungsstelle von Immunglobulinen sein, z. B. ein F_{ab}-Fragment oder andere Moleküle, die eine hohe Affinität zu der antigenen Region oder benachbarten Regionen aufweisen. Derartige Moleküle können
20 beispielsweise aus Molekül-Banken im Hinblick auf ihre Affinität gescreent werden. Bei bekannter dreidimensionaler Struktur der antigenen Region oder des Kapsidproteins können eine Reihe von potentiell bindenden Molekülen konzipiert und synthetisiert werden, die anschließend auf ihre Affinität getestet werden können.

Unter Modifikation wird beispielsweise aber auch eine oder mehrere Mutationen, also Veränderungen der Abfolge der Aminosäuren, verstanden. Der Begriff Mutation beinhaltet z. B. eine Punktmutation, eine Mutation mehrerer Aminosäuren, eine oder mehrere Deletion(en), eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombination dieser Mutationen sein. Dabei kann die Punktmutation oder die Mutation mehrerer Aminosäuren innerhalb von T- oder B-
30 Zellepitopen liegen und die Modifikation gleichzeitig aus Punktmutationen, Mutationen mehrerer Aminosäuren, Insertionen und/oder Deletionen bestehen.

In einer bevorzugten Ausführung wird Protein oder Peptid, vorzugsweise immunsuppressives Protein oder Peptid, inseriert. Dabei kann das Peptid aus beispielsweise 5 bis 30 Aminosäuren,
35 vorzugsweise 8 bis 20 Aminosäuren und insbesondere 10 bis 18 Aminosäuren bestehen. Das

Peptid hat beispielsweise die Sequenz QAGTFALRGDNPQG oder eine Sequenz, die zu dieser stark homolog ist.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Strukturprotein, das mindestens eine weitere
5 Modifikation enthält. Darunter ist zu verstehen, daß das Strukturprotein neben einer Modifikation, die eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt, auch eine weitere Modifikation enthält, die nicht zwangsläufig auch eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt. Besonders bevorzugt ist hier eine weitere Modifikation, die eine Änderung, vorzugsweise Erhöhung, der Infektiosität des Virus bewirkt.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt/stellen die weiteren Modifikation/en eine oder mehrere Deletionen und/oder eine oder mehrere Insertionen im Strukturprotein oder Kombinationen dieser Modifikationen dar. Dabei ist die Insertion vorzugsweise die Insertion eines Zellmembranrezeptor-Liganden, eines Rep-Proteins oder -Peptids, beispielsweise in Form
15 einer Rep-Domäne, eines immunsuppressiven Proteins oder Peptids und/oder eines Proteins oder Peptids mit einem Signal zur Doppelstrangsynthese eines Transgens bzw. Fremdgens.

Beispiele von weiteren Insertionen sind u.a. Integrine, Cytokine oder Rezeptor-Bindungsdomänen von Cytokinen, Integrinen oder Wachstumsfaktoren, wie z.B. GM-CSF, IL-2, IL-12,
20 CD40L, TNF, NGF, PDGF oder EGF, an Zelloberflächenrezeptoren bindende einzelkettige Antikörper, sog. "single chain" Antikörper (scFv), beispielsweise an die Oberflächenrezeptoren CD40, CD40L, B7, CD28 oder CD34 bindende einzelkettige Antikörper, oder Epitope bzw. Rezeptorbindungsstellen, die beispielsweise ihrerseits von bestimmten Antikörpern, beispielsweise Anti-CD40L-monoklonale Antikörper, bzw. von chemischen Substanzen oder
25 Hormonen, z.B. Katecholamine, erkannt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der weiteren Modifikation werden antikörperbindende Strukturen, wie z.B. Protein A, Protein G oder anti-Fc-Antikörper, bzw. Teile hiervon, inseriert.
An diese werden wiederum spezifische Antikörper gegen bestimmte Zelloberflächenstrukturen
30 (beispielsweise gegen das CD40 bei lymphatischen Zellen oder gegen das CD34 bei hämatopoietische Zellen) angekoppelt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird (werden) die Modifikation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der XhoI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure und in einer

anderen bevorzugten Ausführungsform an der BsrBI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Strukturproteins entsteht durch eine Deletion zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure und eine oder mehrere Insertionen, vorzugsweise an der Stelle der
5 Deletion.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird (werden) die Modifikation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure, die 62 Aminosäuren umfaßt (Hermonat, P. L. et al. (1984),
10 J. Virol., 51, 329-339) bewirkt. In einer weiteren bevorzugten und entsprechenden Ausführungsform liegt die Deletion(en) zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure, die innerhalb der oben beschriebenen Deletion liegt und 29 Aminosäuren umfaßt. Diese Deletion hat den Vorteil, daß sie keine Überlappung mit dem rep-Gen hat und daher den Verpackungsmechanismus im wesentlichen nicht beeinflusst.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegen ein oder mehrere Insertionen im VP3-Strukturprotein (Rutledge, E. A. et al. (1998) supra) vor und/oder nach mindestens einer Aminosäure in der Sequenz ausgewählt aus YKQIS SQSGA, YLTLN NGSQA, YYLSR TNTPS, EEKFF PQSGV, NPVAT, EQYGS, LQRGN RQAAT, NVDFD VDTNG, da diese
20 Stellen an den exponierten Stellen eines Loops liegen, wobei das Risiko gering ist, die VP3-Struktur zu ändern.

Die Punktmutation(en), die Mutation(en) mehrerer Aminosäuren, die Deletion(en) oder Insertion(en) wird/werden nach allgemein bekannten Methoden durch Deletion und Insertion in
25 dem für das Strukturprotein codierenden Gen durchgeführt. Die Deletionen lassen sich beispielsweise mittels PCR-unterstützter Mutagenese in die einzelnen Strukturprotein-Gene einführen. Die Insertionen lassen sich nach allgemein bekannten Methoden beispielsweise mittels Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen der entsprechenden Strukturprotein-Gene und anschließender Ligasereaktion einfügen. Die anschließende Expression des mutierten Gens
30 führt zum erfindungsgemäßen Strukturprotein.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein erfindungsgemäßes Strukturprotein in Form eines AAV-Partikels, insbesondere in Form eines AAV-Kapsids, da

Partikel bzw. Kapside als Träger von ausgewählten Verbindungen, z.B. rAAV-Transduktionsvektoren, besonders geeignet sind.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind eine Nukleinsäure, vorzugsweise eine RNA oder DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA, kodierend für ein erfindungsgemäßes Strukturprotein.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Zelle, vorzugsweise eine Säugetierzelle, beispielsweise eine COS-Zelle, HeLa-Zelle oder 293-Zelle, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure. Derartige Zellen eignen sich beispielsweise zur Herstellung der rekombinanten AAV-Partikel.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Strukturproteins, insbesondere zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Strukturproteins in Form eines AAV-Partikels, wobei eine geeignete Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure, kodierend für das erfindungsgemäße Strukturprotein kultiviert und ggf. das exprimierte Strukturprotein isoliert wird. Beispielsweise läßt sich das erfindungsgemäße Strukturprotein über einen Cäsiumchlorid-Gradienten, wie beispielsweise in Chiorini, J. A. et al. (1995), supra, beschrieben, isolieren.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf ein Arzneimittel, enthaltend ein erfindungsgemäßes Strukturprotein oder eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder eine erfindungsgemäße Zelle und ggf. geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe, wie z.B. eine physiologische Kochsalzlösung, Stabilisatoren, Proteinase-, DNase-Inhibitoren, etc.

Des weiteren ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Arzneimittel, das mindestens zwei verschiedene erfindungsgemäße Strukturproteine enthält, die jeweils unterschiedliche Modifikationen aufweisen. Besonders bevorzugt ist dabei, daß sie unterschiedliche Antigenität besitzen.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist ein Kit, enthaltend mindestens zwei verschiedene erfindungsgemäße Strukturproteine, bei dem jedes Strukturprotein getrennt von dem/den anderen Strukturprotein(en) in dem Kit vorliegt.

Für eine Anwendung des Kits bzw. des Arzneimittels mit mindestens zwei verschiedenen erfindungsgemäßen Strukturproteinen, beispielsweise im Rahmen einer Therapie, wird dabei zunächst ein Strukturprotein angewandt. Für eine oder mehrere spätere Anwendung(en) wird/werden Strukturproteine mit anderer Antigenität verwendet. Eine Therapie mit Hilfe des
5 Arzneimittels bzw. Kits umfaßt also die sukzessive Gabe erfindungsgemäßer Strukturproteine. Das Arzneimittel bzw. der Kit haben damit den Vorteil, daß (1) die bei wiederholter Anwendung des gleichen Strukturproteins ausgelöste Potenzierung einer Immunantwort vermieden werden kann und daß (2) im Fall der Auslösung einer Immunreaktion während der ersten Anwendung, durch Verwendung eines Strukturproteins mit unterschiedlicher Antigenität, die vorhandene
10 Abwehrreaktion gegen diese zweite Anwendung weniger wirksam als gegen eine Anwendung mit dem ersten Strukturprotein ausfällt. Die somit verminderte Immunisierung des Patienten erhöht die Wirksamkeit. Für fortlaufende Anwendungen kann so mehrfach zwischen verschiedenen Strukturproteinen gewechselt werden, um eine Immunisierung eines Patienten so niedrig als möglich zu halten. Bevorzugt ist ein Satz von mehreren Strukturproteinen in Form
15 von infektiösen Partikeln mit unterschiedlicher Antigenität, die als Vektor für den mehrfachen Transfer von beispielsweise identischen therapeutischen Genen verwendet werden. Ein weiteres Arzneimittel umfaßt einen Satz von Strukturproteinen in Form von infektiösen Partikeln, die als Vektor für unterschiedliche Therapien verwendet werden.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die Verwendung des erfindungsgemäßen Strukturproteins für die Änderung der Antigenität von AAV, für die Transformation einer Zelle und/oder - in Form von geeigneten rAAV-Vektoren - für die Gentherapie. Unter Gentherapie versteht man eine Therapieform, bei der durch die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ein Effektorgen und somit meist ein Protein
25 exprimiert wird. Man unterscheidet prinzipiell In-vitro- und In-vivo-Verfahren. In In-vitro-Verfahren werden Zellen aus dem Organismus entfernt und ex-vivo mit Vektoren transduziert, um anschließend wieder in denselben oder in einen anderen Organismus eingebracht zu werden. Bei der In-vivo-Gentherapie werden Vektoren, beispielsweise zur Bekämpfung von Tumoren, systemisch (z.B. über die Blutbahn) oder lokal (z.B. in den
30 Tumor) appliziert.

Ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß durch die erfindungsgemäße Mutagenese von Strukturproteinen von AAV die Antigenität im wesentlichen ohne Verlust der Verpackungseffizienz rekombinanter AAV-Vektoren - und damit der Grundvoraussetzung der

Infektiosität - innerhalb des Kapsids des Virus geändert werden kann. Die vorliegende Erfindung eignet sich daher im besonderen Maße für die in vivo Transduktion von Zellen, beispielsweise für die somatische Gentherapie, wenn eine verminderte Immunisierung von Patienten erwünscht ist.

5

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

Beispiel 1

10 P1-Mutation im VP3:

Zunächst wurde von einem Plasmid pUC-AV2, das durch Subklonierung des 4.8-kb BglII-Fragments des pAV2 (ATCC 37261, ref. 53) in die BamHI Schnittstelle des pUC19 (New England BioLabs Inc.) hergestellt wurde, ausgegangen. Mittels dem Fachmann bekannter
15 PCR-unterstützter Mutagenese wurden an definierten Stellen des Plasmids Mutationen vorgenommen. Dabei wurde eine für P1, ein 14-AS-Peptid, mit der AS-Sequenz QAGTFALRGDNPQG, das das RGD-Bindungsmotiv eines Lamininfragments (Aumailley et al. (1990) FEBS Lett. 262, 82-86) enthält, codierende Sequenz nach den Nukleotiden 2985, 3345 und 3963 eingefügt. Dies entspricht einer Insertion nach den Aminosäuren 261, 381 und
20 587 des AAV2-Kapsidproteins (Nomenklatur nach Zahl der Aminosäuren (AS) gezählt nach den AS ab Beginn des N-Terminus im VP-1 von AAV2). In der anschließenden PCR werden jeweils 2 mutationsspezifische Primer und als Matrize ein Plasmid, pCap verwendet, das nur das cap-Gen enthält und dadurch gebildet wird, daß das 2.2 kb EcoRI-BspMI-Fragment aus pUC-AV2 herausgeschnitten und in die EcoRI-Schnittstelle des pUC19 eingefügt wird.
25 Anschließend werden die PCR Produkte in Bakterien amplifiziert, sequenziert und das 1.4-kb EcoNI-XcmI-Fragment, das P1 enthält in pUC-AV2, in dem die korrespondierende Wildtyp-cap-Sequenz herausgeschnitten wurde, subkloniert. Dementsprechend enthielten die nach den AS-Insertionsstellen pI-261, pI-381 und pI-587 genannten Plasmide (Mutanten) das komplette AAV2-Genom. Die entsprechenden Proteine werden mit I-261, I-381 und I-587 bezeichnet.

30

Beispiel 2

Herstellung von AAV2-Partikeln

HeLa-Zellen (eine humane Cervix-Epithel-Zelllinie) wurden mit den Plasmiden gemäß Beispiel 1
35 transfiziert, dann ca. 20h inkubiert und anschließend mit Adenovirus Typ 5 infiziert. 72 h nach

der Infektion wurden die Zellen aufgeschlossen und die AAV2-Partikel über einen CsCl-Gradienten gereinigt.

Beispiel 3

5 Charakterisierung der Kapsidmutanten gemäß Beispiel 1

In diesen Versuchen sollte festgestellt werden, ob die Kapsidmutanten das virale Genom verpacken und vollständige Kapside bilden können. AAV2-Partikel der Mutanten gemäß Beispiel 2 wurden darauf überprüft, ob und wenn ja wieviele Partikel das Virus-Genom tragen
10 und wieviel DNA in den Kapsid-Mutanten verpackt war. Dazu wurden die gemäß Beispiel 2 gereinigten Viren (Mutanten und Wildtyp) mit DNase behandelt, geblottet und mit einer Rep-Sonde hybridisiert.

Der sich daraus ergebende Titer zeigte keine quantitative oder qualitative Differenz im
15 Vergleich zum Wildtyp (s. Tabelle 1). Die Viren behielten die Fähigkeit, das Genom zu verpacken.

Durch Elektronenmikroskopanalyse konnte weiter bestätigt werden, daß auch das Kapsid
20 ausgebildet wird.

Daher wurden die Mutationen nicht in Bereichen vorgenommen, die für die korrekte Faltung, die Kapsid-Zusammensetzung oder die Verpackung des Genoms von Bedeutung sind. Die erfindungsgemäßen AAV-Partikel sind in ihrer Funktion ungestört.

25 Beispiel 4

Antigenität der Kapsidmutanten gemäß Beispiel 1

Um die Antigenität der mutierten Kapside ablesen zu können, wurden in einem weiteren Experiment A20 monoklonale Antikörper (A20MAb) in einem ELISA eingesetzt. A20MAb
30 reagieren spezifisch mit komplett zusammengesetztem AAV2-Kapsid des Wildtyps (Wistuba et al., (1997), J. Virol. 71, 1341-1352). Auch hier sind die Ergebnisse in Tabelle 1 dargestellt. Dabei zeigt sich, daß durch die Insertion in den Mutanten I-261 und I-381 im Gegensatz zum Wildtyp und I-587 der A20 monoklonale Antikörper nicht mehr binden kann.

Tabelle 1 Verpackungseffizienz und Antigenität der hergestellten Virusmutanten gemäß Beispiel 1

Virusstock	genomische Virustiter	ELISA mit A20-MAb
Wildtyp-Kapsid	$8 \cdot 10^{13}$	$6 \cdot 10^{12}$
Mutanten		
I-261	$1 \cdot 10^{12}$	n.m.
I-381	$1 \cdot 10^{12}$	n.m.
I-587	$4 \cdot 10^{13}$	$3 \cdot 10^{12}$

- 5 Gezeigt sind die genomischen Virustiter (Dot-Blot) und der Titer mit A20-Kapsid-ELISA. Die Konzentrationen sind in Partikel/ml angegeben. „n.m.“ heißt „nicht meßbar“.

Beispiel 5

Infektionstests mit Kapsidmutanten gemäß Beispiel 1

- 10 Um den Tropismus der Kapsidmutanten I-261, I 381 und I-587 zu testen, wurden die Zellen der Zelllinie Co-115 mit den mutierten Viren infiziert. Co-115-Zellen wurden zum Testen des Wildtyprezeptor-Tropismus der Virionen verwendet, da diese gegenüber Wildtyp AAV2 anfällig sind. Drei Tage nach der Infektion wurden die Zellen durch Immunofluoreszenzmessung mit Hilfe eines anti-Rep-Antikörpers darauf untersucht, ob das
- 15 virale Rep-Protein exprimiert wird (Wistuba et al. (1997) J. Virol. 71, 1341-1352; Wistuba et al. (1995) J. Virol. 69, 5311-5319). Zellen wurden auf Objektträgern zu 70 % Konfluenz gezüchtet und mit verschiedenen Konzentrationen erfindungsgemäßer viraler Präparationen in serumfreiem Medium zusammen mit Adenovirus 5 inkubiert. Die Titer der viralen Präparationen wurden drei Tage später entweder durch in-situ-Detektion der Rep-
- 20 Proteinsynthese in einem Immunofluoreszenzassay (Rep-Titer) bestimmt. Dabei wurde die Immunofluoreszenzanfärbung mit AAV2-infizierten Zellen nach einer Methode von Wistuba et al. (Wistuba et al. (1997) J. Virol. 71, 1341-1352; Wistuba et al. (1995) J. Virol. 69, 5311-5319) durchgeführt. Die Objektträger wurden einmal mit PBS gewaschen, in Methanol (5 min, 4°C) fixiert und anschließend mit Aceton (5 min, 4°C) behandelt. Die Zellen wurden
- 25 dann für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Antikörper 76-3, der mit Rep-Proteinen von AAV2 reagiert, inkubiert. Anschließend wurde gewaschen und für eine Stunde mit einem Rhodamin-konjugierten Anti-Maus-sekundären Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit 1% BSA inkubiert. Die Titer wurden aus der letzten

limitierenden Verdünnung der viralen Stammlösung errechnet, die zu fluoreszenzpositiven Zellen geführt hatten.

Nach Infektion mit Wildtyp AAV2 und den Mutanten I-261 und I-587 konnten Rep-positive CO115-Zellen detektiert werden, wobei die Infektiosität der Mutanten um zwei bis drei Größenordnungen kleiner war als die des Wildtyps, bzw. eine Mutante nicht infektiös war (I-381) (Tabelle 2). Es konnte aber gezeigt werden, daß bei der Mutante I-261 trotz verringerer Antigenität (s. Beispiel4) die Infektiosität erhalten blieb.

10 Tabelle 2: Virustiter auf der Zelloberfläche

Virusstock	Titer auf CO115-Zellen
Wildtyp-Kapsid	$2 \cdot 10^9$
Mutanten	
I-261	$7 \cdot 10^6$
I-381	n.m.
I-587	$1 \cdot 10^7$

Gezeigt sind die Titer auf den wildtypanfälligen CO115-Zellen. Die Titer sind für I-261, I-381 und I-587 wie den Wildtyp in Rep-EFU/ml ausgedrückt. Dabei bedeutet EFU expressionsbildende Einheiten (Expressing Forming Unit). Dabei heißt „n.m.“ „nicht meßbar“.

5

PATENTANSPRÜCHE

1. Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus (AAV), dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturprotein mindestens eine Modifikation
10 enthält, die eine Verringerung der Antigenität des Virus bewirkt.
2. Strukturprotein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation keine wesentliche Verringerung der Infektiosität des Virus bewirkt.
- 15 3. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das mutierte Strukturprotein zur Partikelbildung befähigt ist.
4. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es ausgewählt ist aus modifiziertem VP1, modifiziertem VP2 und/oder
20 modifiziertem VP3.
5. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es abgeleitet ist von AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 und/oder
25 AAV6 sowie anderen von diesen, insbesondere von AAV2, abgeleiteten AAV-Serotypen.

6. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation(en) an der Virusoberfläche lokalisiert ist/sind.
- 5 7. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation(en) am N-Terminus des Strukturproteins lokalisiert ist/sind.
- 10 8. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation auf einer kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung einer oder mehrerer hoch- oder niedermolekularen Verbindung, beispielsweise von Biotin, eines Mono- oder Oligosaccharids, einer Hydroxidgruppe oder eines F_{ab}-Fragments, an eine oder mehrerer Aminosäuren oder Aminosäuresequenzen beruht.
-
- 15 9. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation eine Mutation ist, beispielsweise eine Punktmutation, eine Mutation mehrerer Aminosäuren, eine oder mehrere Deletion(en), eine oder mehrere Insertion(en) oder eine
- 20 Kombination dieser Mutationen ist.
10. Strukturprotein nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Protein oder Peptid, vorzugsweise immunsuppressives Protein oder Peptid inseriert wird.
- 25 11. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Strukturprotein mindestens eine weitere Modifikation enthält.
-

12. Strukturprotein nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Modifikation(en) eine Änderung der Infektiosität des Virus bewirkt.

5

13. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere(n) Modifikation(en) eine oder mehrere Deletion(en), eine oder mehrere Insertion(en) oder eine Kombination dieser Modifikationen ist.

10

14. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion ein Zellmembranrezeptor-Ligand, ein Rep-Protein oder -Peptid, ein immunsuppressives Protein oder Peptid und/oder ein Protein oder Peptid mit einem Signal zur Doppelstrangsynthese des Fremdgens ist.

15

15. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion ausgewählt ist aus einem Integrin, einem Cytokin oder einer Rezeptor-Bindungsdomäne von einem Cytokin, Integrin oder Wachstumsfaktor, an einem Zelloberflächenrezeptor bindenden einzelkettigen Antikörper, einem Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen, einer antikörperbindenden Struktur oder einem Epitop.

20

16. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der XhoI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.

25

17. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation(en) durch eine oder mehrere Insertionen an der BsrBI-Schnittstelle der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.
- 5
18. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure und eine oder mehrere Insertionen bewirkt wird/werden.
- 10
19. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den XhoI-XhoI-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.
-
- 15
20. Strukturprotein einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation(en) durch eine oder mehrere Deletionen zwischen den BsrBI-HindII-Schnittstellen der VP1-kodierenden Nukleinsäure bewirkt wird/werden.
- 20
21. Strukturprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Insertionen in VP3 vor und/oder nach mindestens einer Aminosäure in der Sequenz ausgewählt aus YKQIS SQSGA, YLTLN NGSQA, YYLSR TNTPS, EEKFF PQSGV, NPVAT
- 25
- EQYGS, LQRGN RQAAT, NVDFT VDTNG, lokalisiert ist/sind.
22. Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21 in Form eines AAV-Partikels, insbesondere in Form eines AAV-Kapsids.
-

23. Nukleinsäure, kodierend für ein Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 22.
- 5 24. Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 22.
25. Verfahren zur Herstellung eines Strukturproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zelle gemäß Anspruch 23 kultiviert und ggf. das exprimierte Strukturprotein isoliert wird.
- 10 26. Arzneimittel, enthaltend ein Strukturprotein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21, eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 22 und/oder eine Zelle gemäß Anspruch 23 und/oder gegebenenfalls Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
- 15 27. Arzneimittel enthaltend mindestens zwei verschiedene Strukturproteine gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Strukturprotein eine unterschiedliche Modifikation aufweist.
- 20 28. Kit enthaltend mindestens zwei verschiedene Strukturproteine gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß jedes Strukturprotein getrennt von dem/den anderen Strukturprotein(en) in dem Kit vorliegt.
- 25 29. Verwendung eines Strukturproteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21, einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 22 und/oder einer Zelle gemäß Anspruch 23 für die Änderung der Antigenität von AAV, für die Transformation einer Zelle und/oder für die Gentherapie.

SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> MediGene Aktiengesellschaft

 <120> Strukturprotein von Adeno-assoziiertem Virus mit veränderter
 Antigenität, seine Herstellung und Verwendung

10 <140> 199 33 288.6

 <141> 15.07.1999

 <160> 9

15 <170> Word 6.0, PC-DOS/MS-DOS

 <210> 1

 <211> 14

 <212> PRT

20 <213> Mus musculus

 <400> 1

25 Gln Ala Gly Thr Phe Ala Leu Arg Gly Asp Asn Pro Gln Gly 14

 <210> 2

 <211> 10

30 <212> PRT

 <213> Adeno-assoziiertes Virus

 <400> 2

35 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala 10

 <210> 3

	<400> 3	
	Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala	10
5	<210> 4	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Adeno-assoziiierter Virus	
10	<400> 4	
	Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser	10
15	<210> 5	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Adeno-assoziiierter Virus	
20	<400> 5	
	Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val	10
25	<210> 6	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Adeno-assoziiierter Virus	
30	<400> 6	
	Asn Pro Val Ala Thr	5
35	<210> 7	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Adeno-assoziiierter Virus	

- 3 -

	<400> 7	
	Glu Gln Tyr Gly Ser	5
5	<210> 8	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Adeno-assoziiertes Virus	
10	<400> 8	
	Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr	10
	<210> 9	
15	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Adeno-assoziiertes Virus	
20	<400> 9	
	Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly	10
25		



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No
PCT/EP 00/06692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/864 C12N15/35 C12N15/62 C07K14/015 C12N5/10
A61K39/23 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 38723 A (BARBER JACK ; IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU) 23 October 1997 (1997-10-23) page 4, line 21 -page 5, line 2 page 17, line 11 -page 18, line 2 page 26, line 17 -page 27, line 7 example 1 example 2C	1-15, 21-29
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 November 2000

Date of mailing of the international search report

29/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31-651 epo.nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/EP 00/06692

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YANG Q. ET AL.: "DEVELOPMENT OF NOVEL CELL SURFACE CD34-TARGETED RECOMBINANT ADENOASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, vol. 9, no. 13, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 1929-1937, XP000867311 ISSN: 1043-0342 the whole document</p>	1-15, 21-29
A	<p>VALSESIA-WITTMANN S. ET AL.: "MODIFICATIONS IN THE BINDING DOMAIN OF AVIAN RETROVIRUS ENVELOPE PROTEIN TO REDIRECT THE HOST RANGE OF RETROVIRAL VECTORS"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 7, 1 July 1994 (1994-07-01), pages 4609-4619, XP000616602 ISSN: 0022-538X the whole document</p>	1-29
A	<p>WICKHAM T. J. ET AL.: "Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 11, no. 71, 1 November 1997 (1997-11-01), pages 8221-8229, XP002078898 ISSN: 0022-538X the whole document</p>	1-29
A	<p>WO 96 00587 A (UNIV PITTSBURGH) 11 January 1996 (1996-01-11) page 5, line 10 - line 14 page 23, line 11 -page 24, line 25</p>	1-29
P,X	<p>GIROD A. ET AL.: "GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2"</p> <p>NATURE MEDICINE, vol. 5, no. 9, September 1999 (1999-09), pages 1052-1056, XP002128040 ISSN: 1078-8956 cited in the application the whole document</p>	1-15, 21-25
P,X, L	<p>WO 99 67393 A (MEDIGENE AKTIENGESSELLSCHAFT ;RIED MARTIN (DE); GIROD ANNE (DE); HA) 29 December 1999 (1999-12-29) L: Priorität the whole document</p>	1-26,29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Application No

PCT/EP 00/06692

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9738723	A	23-10-1997	AU 2678097 A	07-11-1997
			CA 2251738 A	23-10-1997
			EP 0927044 A	07-07-1999
WO 9600587	A	11-01-1996	AU 705564 B	27-05-1999
			AU 2913895 A	25-01-1996
			CA 2193802 A	11-01-1996
			EP 0766569 A	09-04-1997
			JP 10502526 T	10-03-1998
			US 5863541 A	26-01-1999
WO 9967393	A	29-12-1999	DE 19827457 C	02-03-2000
			AU 4614199 A	10-01-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. ☒ Patentzeichen

PCT/EP 00/06692

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/864 C12N15/35 C12N15/62 C07K14/015 C12N5/10
A61K39/23 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 38723 A (BARBER JACK ; IMMUSOL INC (US); LI QI XIANG (US); YU GANG (US); YU) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) Seite 4, Zeile 21 -Seite 5, Zeile 2 Seite 17, Zeile 11 -Seite 18, Zeile 2 Seite 26, Zeile 17 -Seite 27, Zeile 7 Beispiel 1 Beispiel 2C	1-15, 21-29
	---	-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo mt.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mand1, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>YANG Q. ET AL.: "DEVELOPMENT OF NOVEL CELL SURFACE CD34-TARGETED RECOMBINANT ADENOASSOCIATED VIRUS VECTORS FOR GENE THERAPY"</p> <p>HUMAN GENE THERAPY, Bd. 9, Nr. 13, 1. September 1998 (1998-09-01), Seiten 1929-1937, XP000867311 ISSN: 1043-0342 das ganze Dokument</p>	1-15, 21-29
A	<p>VALSESIA-WITTMANN S. ET AL.: "MODIFICATIONS IN THE BINDING DOMAIN OF AVIAN RETROVIRUS ENVELOPE PROTEIN TO REDIRECT THE HOST RANGE OF RETROVIRAL VECTORS"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 7, 1. Juli 1994 (1994-07-01), Seiten 4609-4619, XP000616602 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-29
A	<p>WICKHAM T. J. ET AL.: "Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 11, Nr. 71, 1. November 1997 (1997-11-01), Seiten 8221-8229, XP002078898 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument</p>	1-29
A	<p>WO 96 00587 A (UNIV PITTSBURGH) 11. Januar 1996 (1996-01-11) Seite 5, Zeile 10 - Zeile 14 Seite 23, Zeile 11 -Seite 24, Zeile 25</p>	1-29
P,X	<p>GIROD A. ET AL.: "GENETIC CAPSID MODIFICATIONS ALLOW EFFICIENT RE-TARGETING OF ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2"</p> <p>NATURE MEDICINE, Bd. 5, Nr. 9, September 1999 (1999-09), Seiten 1052-1056, XP002128040 ISSN: 1078-8956 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-15, 21-25
P,X, L	<p>WO 99 67393 A (MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT ;RIED MARTIN (DE); GIROD ANNE (DE); HA) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) L: Priorität das ganze Dokument</p>	1-26,29

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Patentzeichen

PCT/EP 00/06692

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9738723 A	23-10-1997	AU 2678097 A	07-11-1997
		CA 2251738 A	23-10-1997
		EP 0927044 A	07-07-1999
WO 9600587 A	11-01-1996	AU 705564 B	27-05-1999
		AU 2913895 A	25-01-1996
		CA 2193802 A	11-01-1996
		EP 0766569 A	09-04-1997
		JP 10502526 T	10-03-1998
		US 5863541 A	26-01-1999
WO 9967393 A	29-12-1999	DE 19827457 C	02-03-2000
		AU 4614199 A	10-01-2000



1
2
3

4
5
6